

酸素分析法による胚のガス代謝及び酸素依存の評価

著者	吉村 吉博
雑誌名	星薬科大学紀要
号	27
ページ	1-9
発行年	1985
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000056/

酸素分析法による胚のガス代謝及び酸素依存の評価

吉 村 吉 博

星薬科大学 薬品分析化学教室

Evaluation of Oxygen Dependence and Gas Exchange
of Embryo by the Use of Oxygen Absorption Measuring Apparatus

YOSHIHIRO YOSHIMURA

Department of Analytical Chemistry, Hoshi University

1. はじめに

酸素はクラーク数約50%で自然界に最も豊富に存在し、人体の組織構成成分の66%を占める。人体に対する酸素の影響は大きく、その許容限界は16-50%とされており¹⁾、それ以外の濃度で生体は非可逆的障害を受ける²⁾。

大気中の酸素不足は低酸素血症となり、チアノーゼ、呼吸器系、心臓血管系及び中枢神経系の変化を引き起こし、また虚血により個々の組織の損傷を引き起こす。血中酸素分圧が18mmHg以下では呼吸不全に陥り死亡する。一方、高酸素血症は一般に大気中では起きず、循環障害、急性呼吸困難及び一酸化炭素中毒などの治療手段として用いられている高酸素療法の中毒作用としてしばしばみられる。例えば未熟児網膜症もその毒性の一つであり、多くの組織障害が報告されている³⁾。

このように高酸素、低酸素濃度に対する各組織の影響は大きく、呼吸も同様に影響を受け、その抑制作用などがみられるが、詳細については不明な点が多い。また酸素は生体内脂質と反応して過酸化脂質を生ずる。しかし過酸化脂質とガス代謝との関係が明らかにされていない。

著者は物質の安定性評価のために酸素吸収測定装置を考案、製作し、薬物、高分子化合物及び油脂食品の安定性を検討した⁴⁾⁻⁷⁾。この装置を生体のガス代謝測定のために改良を行い、生体の高、低酸素依存に対するガス代謝変化を検討し、併せて生体中の過酸化脂質の変化についても追求した。酸素に対する毒性は分裂細胞の盛んな胎児に大きいことから、胎児のモデルとして発生学的に類似し、外界からの影響を受けやすいアヒル及び鶏の有精卵を用いた。

2. 胚のガス代謝と卵殻の物性変化

ヒトのガス代謝測定は多くの方法が報告されている⁸⁾が、いずれも長期間のガス代謝測定に、用いることはできない。このガス代謝測定は臨床面で基礎代謝測定的手段に用いられ甲状腺機能障害、副腎機能障害などの検査に応用されている。

有精卵のガス代謝測定は古くは Romijn ら⁹⁾によってマノメータによるガス分析が行われ、その後多くの報告がある¹⁰⁾⁻¹⁵⁾が、いずれも卵殻の一部を破壊し、気室内の気体を分析する方法で長期間連続測定できない。従って、著者は有精卵のガス代謝を非破壊的に連続自動測定できる装置を考

本研究の一部は昭和58年度星薬科大学大谷研究助成の対象となったものである（紀要委員会）。

案, 製作し¹⁶⁾ (Fig 1), 有精卵の孵卵に伴う酸素吸収量を検討した。

酸素吸収測定装置のセル (270ml) の中に有精卵を入れ, セル下部にはガス代謝により生成される炭酸ガスを吸収する目的で水酸化カリウムを入れる。このセルを硫酸ナトリウム電解液を含む恒温槽に入れ $38 \pm 0.01^\circ\text{C}$ に保つ。胚のガス代謝に伴

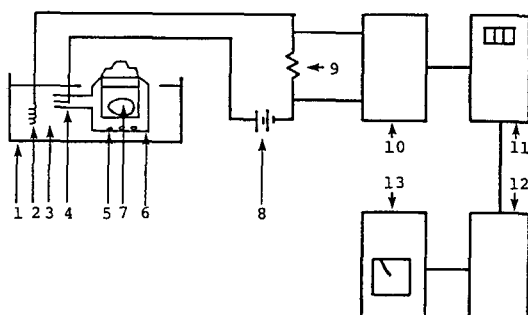


Fig. 1 Oxygen absorption measuring apparatus
1. thermostat ($38 \pm 0.01^\circ\text{C}$); 2. platinum electrode ($1\phi \times 10\text{mm}$); 3. electrolytic solution (sodium sulfate); 4. absorption tube (4mm i. d.); 5. CO_2 absorption agent (potassium hydroxide); 6. cell; 7. fertile egg; 8. power supply (30 V); 9. resistance (5Ω); 10. V/F converter (RC4151); 11. digital counter (MH 730); 12. D/A converter (AD DAC80); 13. recorder.

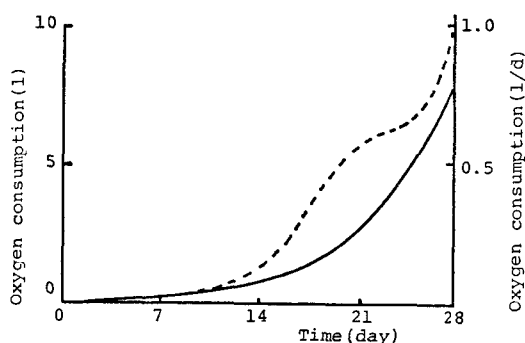


Fig. 2 Cumulative oxygen consumption and daily oxygen consumption of duck embryo during incubation
— : cumulative oxygen consumption;
--- : daily oxygen consumption

いセル内の酸素分圧は減少し吸接管内に電解液が導入され, 白金陽極と接触すると電解回路が閉鎖され, 陽極から酸素が供給される。この電氣量をデジタル量に変換し, さらにD/Aコンバータを介してレコーダに連続記録される。

アヒルの有精卵の酸素吸収量は Fig. 2 にみられるように孵卵に伴い増加し, 発生学的, 解剖学的見地から興味ある知見が得られた。すなわち, 酸素吸収の開始がわずかに認められた4—5日目では胚の各器官が形成され, 胚の物質代謝が開始される時期であり, また酸素吸収量が大きくなる14日目は卵黄内部の血管網の発達が完成される時期と一致する¹⁷⁾。酸素吸収量が最も著しい増加を示す26—28日目は胚の臍尿膜呼吸から肺呼吸への転化が行われ, ピッピングが開始される時期と一致する。

卵殻の物性変化を測定するため, ガス透過測定装置による酸素, 水分, 炭酸ガスの透過性, 卵殻の厚さ, 電子顕微鏡によるクチクラ表面の構造を検討した。

卵殻のガス透過測定は従来マノメータを用いた圧力法¹⁸⁾¹⁹⁾, 電極法¹³⁾などが用いられているが測定時間が長く, 検出器の安定性も悪く, さらに酸

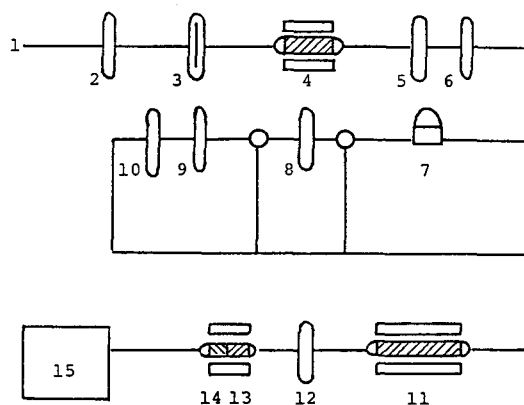


Fig. 3 Gas permeation measuring apparatus
1. carrier gas; 2. silica gel; 3. flow meter; 4. 14. porous copper; 5. 9. 12. sodium hydroxide; 6. 8. 10. magnesium perchlorate; 7. holder; 11. Platinum-carbon; 13. iodine pentoxide; 15. coulometric analyzer.

素, 水分, 炭酸ガスの同時分別定量ができない。今枝が考案, 製作した酸素直接定量装置^{20)~24)}を一部改良して卵殻のガス透過測定に応用した。Fig. 3 にその概略図を示す。卵殻膜を含んだ卵殻をセルに固定し, セル内にキャリアガスを導入し, 大気中から卵殻内に拡散透過した酸素, 水分及び炭酸ガスを酸素直接定量装置に導き, 電量滴定法で測定する。卵殻内へ透過した酸素, 水分, 炭酸ガスは水分吸収管及び炭酸ガス吸収管を組み合わせることによりそれぞれ分別定量ができる。

孵卵中のガス透過量はFig. 4 にみられるように, 14日目以降大きくなり, その中でも水分の透過性が大であった。卵殻の厚さも14日目から21日目にかけて著しく減少し, Fig. 5 にみられるように卵

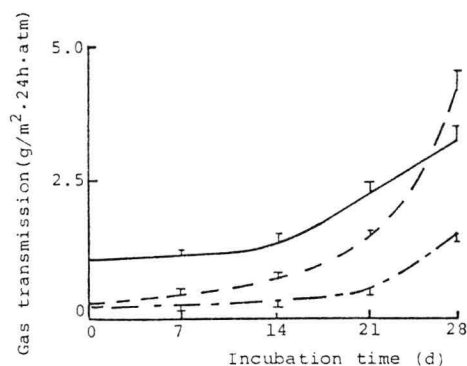


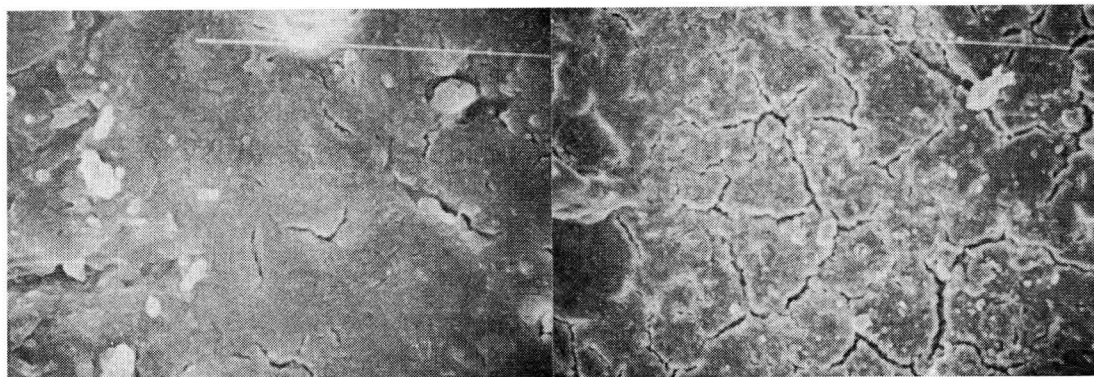
Fig. 4 Eggshell transmission rates of O_2 , H_2O and CO_2 during 28 day incubation time
— : O_2 ; --- : H_2O ; - · - : CO_2

殻表面のクチクラのクラッキングが多くなった。14日から21日目にかけて, 解剖学的に骨格形成時に相当し, 卵殻中カルシウムが胚へ移行し²⁵⁾²⁶⁾, それに伴い卵殻のクチクラ構造, 厚さが変化し, 卵殻のガス透過性が増大したものと考えられる。従って胚の急激な酸素要求に対して大気中から十分満足な酸素供給ができると考えられる。有精卵の気室は鈍端にあり, 21日目の卵殻において鈍端の方が尖端より卵殻が薄く, ガス透過性も大きいことから, 胚のガス交換は鈍端で行われやすいと思われる。

3. 高, 低酸素依存による鶏胚のガス代謝変化

高所の低酸素分圧における鶏胚の呼吸変化についていくつかの報告があり, いずれも低酸素血症を引き起こし, 呼吸抑制を認めている^{27)~29)}。鶏の有精卵はアヒルと異なり21日目に孵化するが, その孵卵中の酸素吸収変化の挙動はアヒルの場合と一致している。孵卵中における鶏胚の酸素吸収量は13日前後に著しく増加する。この時期は外界の影響を最も受けやすく, 胚の死亡率も高いため, 13日胚において高, 低酸素曝露を行い, その酸素依存によるガス代謝変化を検討した。

高酸素濃度として40%, 100%, 低酸素濃度として20, 18, 16及び10%を用い, それぞれ3時間あるいは6時間曝露させた。曝露中の胚の酸素吸



(1) Day 0 (2) Day 21
Fig. 5 Photomicrographs of eggshell surface (x 700)

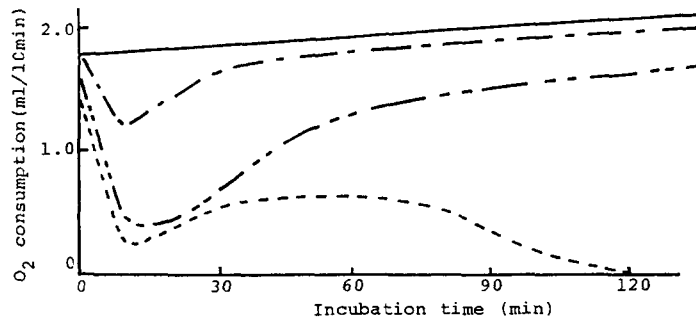


Fig. 6 Changes in oxygen consumption of chick embryos exposed to various concentration of oxygen (n=4)

— : 21%, 40%, 100%; - - - : 20%
- · - · : 18%; - - - : 10%

Chick embryo at the 13th day stage were placed in the chamber of the oxygen absorption measurement apparatus at 10-100% oxygen at 1 atm pressure and 38°C for 3h

収変化は、高酸素濃度では有意な差は認められなかったが、低酸素濃度では、Fig. 6 にみられるように曝露開始直後から一過性の呼吸抑制がみられた。16%以上の胚では孵卵中の呼吸の回復がみられたが、15、10%の低酸素の胚では、孵卵中に呼吸の回復がみられず死亡した。高、低酸素曝露後の胚のガス代謝は、いずれの条件でも孵卵中に慢性的な呼吸の抑制がみられ、低酸素の方が高酸素よりその影響は大であった。13日胚に18%の低酸素、3時間曝露させた場合、Fig. 7 にみられるように孵卵中に胚の呼吸回復がみられたが、ガス代謝が再び著しくなる19日目から13日目の低酸素曝露の影響が現われ呼吸抑制がみられた。これは胚に対する酸素依存性が大きく、組織障害性が高いことを示唆している。

4. 高、低酸素依存による鶏胚の過酸化脂質変化

過酸化脂質は食品化学、油化学分野ばかりでなく最近生体において非常に注目されており、それによる組織障害性は非常に高く、各疾患との相関性が明らかとなっている。例えば動脈硬化³⁰⁾、皮膚障害³¹⁾、妊娠中毒症³²⁾³³⁾および糖尿病³⁴⁾などである。八木らは鶏胚を高酸素条件下に曝露し、胚

の網膜に過酸化脂質が大量に生成することをみい

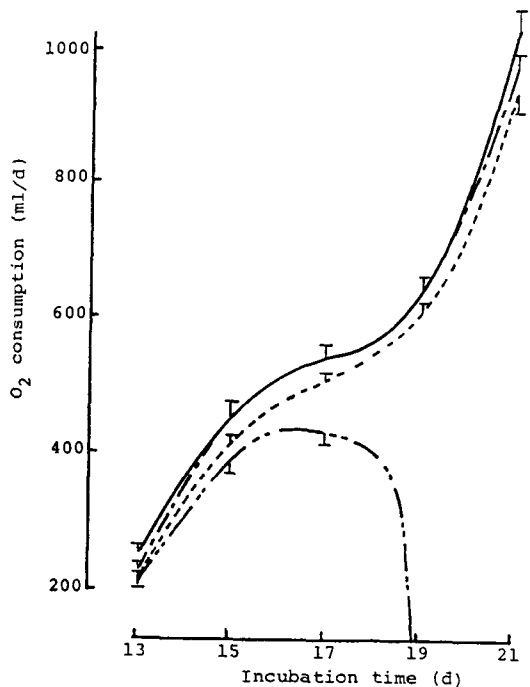


Fig. 7 Changes in oxygen consumption after exposure of 13th day chick embryo to 15-21% oxygen for 3h

— : 21%; - - - : 18%
- · - · : 16%; · · · : 15%

だし、それが未熟児網膜症の原因であることを明らかにしている⁸⁵⁾。

鶏胚を用い、高、低酸素曝露による胚の過酸化脂質生成変化について検討した。13日胚に高酸素、低酸素曝露させた14日胚の血液、心臓、肝臓中の過酸化脂質量を Table 1 に示す。高酸素、低酸素のいずれの条件でも14日胚の血液、心臓及び肝臓中の過酸化脂質の増加を認めた。高酸素濃度では高い濃度ほど、低酸素濃度では低い濃度ほど影響を受けやすく、また低酸素濃度の方が高酸素濃度よりも影響を受けやすかった。また21日目に孵化したヒナの過酸化脂質量は14日目の胚と比較して血中では減少しているのに対して、心臓、肝臓では有意な増加を認めた。このような胚の血液、臓器中の過酸化脂質の増加はガス代謝による呼吸

抑制と著しく相関していることが分った ($r = -0.647$)。

高酸素濃度に対する生体の変化は組織での酸素分圧が高まることにより酸素中毒を引き起こし⁸⁶⁾、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性が低下することから (Table 2)、活性酸素の一種であるスーパーオキシドアニオンの生成が亢進し、それに伴いその他の活性酸素 (一重項酸素、ヒドロキシンラジカル、過酸化水素) も生成されやすく、組織蛋白及び脂質を酸化して過酸化脂質量が増加するものと考えられる。

一方、低酸素濃度では呼吸抑制が現われ、それに伴い末梢組織では虚血が起これ、細胞間で一電子還元により遊離基が生成されやすい。さらに生体を大気中に戻すことにより再酸素化³⁷⁾³⁸⁾が起こ

Table 1 Changes in lipoperoxide level of blood, liver and heart at 14th day upon exposure of chick embryo at 13th day stage to various concentration of oxygen

The level of lipoperoxide was determined by TBA method using TMP as a external standard and expressed as nmol of malondialdehyde. Means \pm S. E. are given.

Student's t-test was made between the values obtained the main and the control experiment.

Oxygen (%)	Lipoperoxide level					
	Blood (nmol/ml)		Heart (nmol/100mg wet weight)		Liver (nmol/100mg wet weight)	
	3h	6h	3h	6h	3h	6h
21	102.7 \pm 9.5	106.9 \pm 6.0	19.6 \pm 3.0	22.1 \pm 3.3	20.8 \pm 2.5	21.2 \pm 2.4
100	120.4 \pm 10.5	189.0 \pm 10.0***	19.1 \pm 2.2	39.2 \pm 2.6***	20.1 \pm 1.9	35.5 \pm 2.2***
40	111.4 \pm 17.6	116.7 \pm 5.1*	19.1 \pm 2.2	26.3 \pm 2.1**	19.9 \pm 1.8	31.8 \pm 2.3***
20	86.0 \pm 23.5		23.6 \pm 2.4		21.3 \pm 2.3	
18	164.7 \pm 26.0***		29.0 \pm 2.2**		22.2 \pm 1.6	
16	207.8 \pm 25.6***		34.8 \pm 2.4***		23.3 \pm 2.3	

* $p < 0.10$

** $p < 0.02$

*** $p < 0.01$

Table 2 SOD activity in blood, heart and liver at 14th day upon exposure of chick embryo at 13th day stage to high and low concentration of oxygen

	SOD activity (unit/mg protein)		
	Blood	Heart	Liver
Control (21%)	2.60 \pm 0.19	6.70 \pm 0.30	1.60 \pm 0.11
100%	1.85 \pm 0.20*	6.30 \pm 0.41*	1.55 \pm 1.20*
18%	1.10 \pm 0.16*	4.95 \pm 0.45*	1.25 \pm 0.15*

* $p < 0.01$

り大量の活性酸素が生成され、過酸化脂質が増加するものと考えられる。

5. 酸素、温度ストレスによる鶏胚のガス代謝と抗酸化剤の影響

ストレスは大きな社会問題となっているが、生体では特に副腎皮質に対する影響が大きく、副腎皮質ホルモンバランスを損いさまざまな疾患の引き金となっている³⁹⁾⁴⁰⁾。そのストレッサーには物理的と精神的なものがあるが、動物実験を行う場合物理的ストレッサーを用いる方が簡便で、個体差も少ない。shmidtら⁴¹⁾は鶏胚に物理的振動ストレッサーを与え、それによる胚のガス代謝を測定し、呼吸抑制することを認めている。著者は鶏胚の成長に重要な因子である酸素、温度をストレッサーとして用い、生体の影響について検討した。

胚に対する高、低酸素曝露によるガス代謝及び過酸化脂質の変化について既に前の項で述べたが、ストレッサーの反復作用に対する影響を検討するために胚に比較的影響の少ない18%酸素を用い、その間欠曝露によるガス代謝、過酸化脂質量を測定した。低酸素濃度で3時間間欠的に曝露した胚は、連続曝露の胚と比較して孵卵中の呼吸抑制及び血中、肝臓の過酸化脂質に有意な増加がみられた (Fig. 8, Table 3)。これは低酸素濃度における胚が一過性の呼吸抑制を示し、それに伴い組織に虚血が起り、大気の酸素分圧に戻ることに伴い大量の活性酸素が生成される。又、間欠曝露では低酸素状態から大気へと繰り返されるため再酸素化が繰り返され、活性酸素の生成が亢進し、過酸化脂質増加を来す。さらに過酸化脂質が生体組織の機能低下に結びつくと考えられる。

低温ストレス条件は、孵卵の下限温度である35°Cで行い、低温ストレスに伴う胚のガス代謝、過酸化脂質量について検討した (Table 4)。ガス代謝は孵卵に伴い著しい抑制がみられ、低酸素ストレスの場合より大であった。同様に過酸化脂質の増加もみられ、特に肝臓において著しかった。

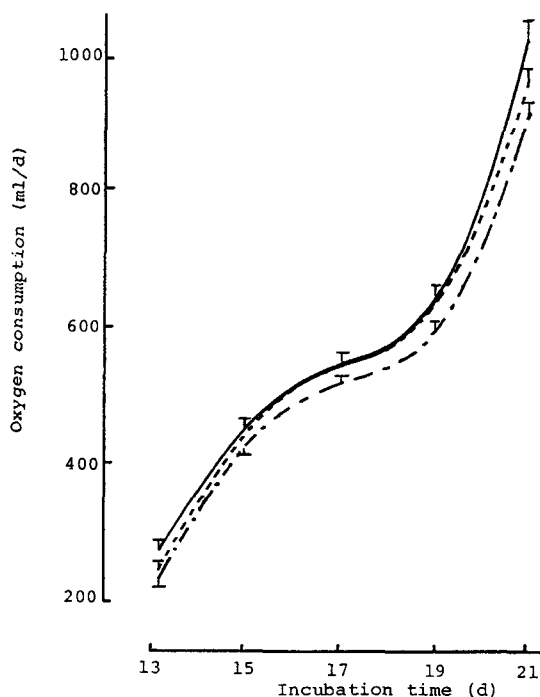


Fig. 8 Oxygen consumption after continuously or intermittently exposure of 13th day chick embryo to 18% concentration of oxygen for 3 h

— : Control; ---- : Continuous exposure
- · - : Intermittent exposure

胚の温度低下に伴い代謝速度が低下し一過性の呼吸抑制がみられる。これがストレスの引き金となり孵卵中の呼吸抑制を導き、さらに低酸素ストレスの場合と同じ機構で血中、臓器中の過酸化脂質の増加をきたしたのと考えられる。

このようなストレスにより生成される活性酸素、過酸化脂質に対して生体はいくつかの防御機構をもっている⁴²⁾⁴³⁾。活性酸素の消去にはカタラーゼ、ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、過酸化脂質の消去にはグルタチオンペルオキシダーゼなどである。こうした酵素系消去剤以外にも抗酸化剤である α -トコフェロール (VE) が生体中で重要な活性酸素、過酸化脂質の生成抑制に関与している。

生体に VE を大量投与し、ストレスに対する抵

Table 3 Changes in lipoperoxide level of blood, heart and liver at 14th day upon exposure continuously or intermittently chick embryo at 13th day stage to 16% or 18% concentration of oxygen for 3 h

Condition	Blood (nmol/ml)	Lipoperoxide lever	
		Heart (nmol/100mg wet weight)	Liver (nmol/100mg wet weight)
Control (21%)	99.6± 9.5	23.5±2.7	22.2±2.6
18%, 2h, (C)	155.3±13.5	25.1±2.2	21.1±2.5
18%, 2h, (I)	173.9±12.4*	26.2±1.7	24.6±3.6*
18%, 3h, (C)	163.9±10.9	29.7±2.4	22.1±1.6
18%, 3h, (I)	175.7±13.8*	27.3±2.3	30.0±3.3**
16%, 2h, (C)	195.8±12.1	26.4±2.3	21.7±2.7
16%, 2h, (I)	212.7±15.7*	27.4±2.2	22.7±2.3
16%, 3h, (C)	209.5±16.2	36.2±3.7	23.3±2.3
16%, 3h, (I)	255.9±20.5**	35.5±4.9	32.5±3.4**

(C): Continuous exposure; (I): Intermittent exposure

*p<0.10, **p<0.05: Significant difference from the continuous exposure in each case

Table 4 Changes in lipoperoxide level of blood, heart and liver at 14th day upon exposure of chick embryo at 13th day stage to 35°C for 1-3 h

Condition	Blood (nmol/ml)	Lipoperoxide level	
		Heart (nmol/100mg wet weight)	Liver (nmol/100mg wet weight)
Control (21%)	100.6± 9.0	18.6±1.7	22.0±3.2
35°C, 1h	93.9± 8.3	23.3±3.7*	26.0±2.5*
35°C, 2h	103.9± 9.8	23.9±2.5*	28.9±3.3**
35°C, 3h	119.8±10.8*	24.3±3.0*	34.5±4.6**

*p<0.10, **p<0.05 compared to the control

Table 5 Changes in lipoperoxide level of blood in chick embryo administrated vitamin E after exposure of chick embryo at 13th day stage to 18% oxygen for 3 h

Condition	Lipoperoxide level in blood (nmol/ml)	
	14th day	21th day
Control (21%)	97.5± 9.2	81.0± 8.4
18% oxygen	148.6±18.2**	106.0±12.5**
Vitamin E	102.0±13.7	77.1±11.4
18% Oxygen-Vitamin E	131.6±17.8*	83.6± 6.9

*p<0.10, **p<0.05 compared to the control

抗性を検討した。すなわち鶏胚を用い、低酸素ストレスを与えた胚に VE を投与しそのガス代謝変化、過酸化脂質量を測定した。低酸素曝露後 VE を投与した胚は曝露直後に呼吸抑制がみられたが、孵卵に伴い徐々に回復し、孵化前後ではコントロールと同程度の酸素吸収量まで回復した。過酸化脂質の変化は Table 5 にみられるようにガス代謝と同様に曝露直後では VE の効果が現われず、過酸化脂質の増加がみられたが、21日目の孵化したヒナでは過酸化脂質量が減少し、コントロールと有意差はみられなかった。従ってストレスによる生体組織の傷害に対して、VE はその抑制及び修復作用のあることが認められた。

6. おわりに

今回外界に影響を受けやすいアヒル胚、鶏胚を用いたが、その胚は母体の中の胎児と発生学的に類似している点が多く、母体中の酸素濃度、温度

の異常が過酸化脂質の増加により胎児に致命的損傷をもたらすことを示唆している。又、低酸素、低温度がストレッサーとして作用する場合、生体は副腎皮質の損傷ばかりでなく、ガス代謝の抑制により過酸化脂質の増加をもたらし、さらに各器官の障害性が高くなることを示唆している。

今回用いた酸素吸収測定装置は小動物のガス代謝を連続自動測定できるばかりでなく、生体の酸素依存性、ストレス評価を行うことができ、さらに過酸化脂質の異常な亢進がみられる多くの疾患の分析手段として期待できるものと考えられる。従って引き続き改良装置の考案に着手している。

謝辞

大谷孝吉理事長から本研究に対し、昭和58年度大谷研究助成金を賜り謹んで感謝申し上げます。

また本研究を行うにあたり、御指導を賜りました今枝一男教授、大沢敬子助教授さらに本学薬品分析化学教室の諸兄姉に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 日本薬学会編, "衛生試験法・注解" 金原出版, 東京, 1980, pp 1073.
- 2) 有富貴道, 吉田 稔, 臨床医, **10**, 15 (1984).
- 3) H. C. Daries and R. E. Davies "Handbook of Physiology" W. O. Fenn and H. Rah ed., Sec 3, Respiration vol. II, **1965**, pp 1047.
- 4) 今枝一男, 大沢敬子, 吉村吉博, 分析化学, **27**, 223 (1978).
- 5) 今枝一男, 大沢敬子, 吉村吉博, 分析化学, **28**, 173 (1979).
- 6) 今枝一男, 大沢敬子, 吉村吉博, 分析化学, **29**, 426 (1980).
- 7) K. Ohsawa, Y. Yoshimura, J. Tsai and K. Imaeda, Bunseki Kagaku, **32**, E 281 (1983).
- 8) 井川幸雄, "ガス代謝" 医学書院, 東京, 1977, pp 57.
- 9) C. Romijn and J. Roos, J. Physiol. (London), **94**, 365 (1938).
- 10) C. Romijn, Poultry Sci., **29**, 42 (1950).
- 11) A. H. J. Visschedijk, Brit. Poultry Sci., **9**, 173 (1968).
- 12) O. D. Wangenstein and H. Rahn, Respir. Physiol., **11**, 16 (1970).
- 13) O. D. Wangenstein, D. Wilson and H. Rahn, Respir. Physiol., **11**, 31 (1970).
- 14) H. Rahn, C. V. Paganelli and A. Ar, Respir. Physiol., **22**, 297 (1974).
- 15) A. L. Romanoff, "Biochemistry of the Avian Embryo", John Wiley and Sons, New York, 1966, pp 287.
- 16) K. Ohsawa, Y. Yoshimura, J. Tsai and K. Imaeda, Anal. Sci., **1**, 131 (1985).
- 17) 野並慶宜, "鶏胚の化学と利用法" 地球出版, 東京, 1960, pp 178.
- 18) A. L. Romanoff, Food Research, **5**, 291, (1943).
- 19) A. Ar, C. V. Paganelli, R. B. Reeres, P. G. Greene and H. Rahn, Condor, **76**, 153 (1974).
- 20) 今枝一男, 分析化学, **12**, 580 (1963).
- 21) 今枝一男, 分析化学, **13**, 79 (1964).
- 22) 今枝一男, 分析化学, **13**, 481 (1964).

- 23) 今枝一男, 分析化学, **15**, 762 (1966).
- 24) 中島正彦, 桜井兵一郎, 坂井 明, 今枝一男, 大沢敬子, 栗木武男, 分析化学, **29**, 744 (1980).
- 25) J. R. Jowsey, Poultry Sci., **35**, 1234 (1956).
- 26) D. B. Kroon, Acta Brevia Neerland Physiol. Pharmacol. Microbiol., **10**, 128 (1941).
- 27) J. Beattie and A. H. Smith, Am. J. Physiol., **228**, 1346 (1975).
- 28) W. Lockhorst and C. Romijn "Energy Metabolism" K. L. Blaytered. New York Academic, 1965, pp 419.
- 29) O. D. Wagensteen, H. Rahn, R. R. Burton and A. H. Smith, Resp. Physiol., **21**, 61 (1974).
- 30) J. Glavind, S. Hartmann, J. Clemunessen, K. E. Jessen and H. Dam, Acta Pathol. Microbiol. Scand., **30**, 1 (1952).
- 31) 早川律子, 臨床皮膚, **29**, 181 (1975).
- 32) 石原 実, 日本産科婦人科学会雑誌, **28**, 399 (1976).
- 33) 吉岡 保, 小池秀爾, 杉山 彰, 大山都志恵, 産科と婦人科, **43**, 823 (1976).
- 34) 坂本信夫, "過酸化脂質と疾患" 八木国夫, 五島雄一郎編, 医学書院, 東京, **1981**, pp 147.
- 35) K. Yagi, S. Matsuoka and H. Ohkawa, Clin. Chem. Acta, **80**, 355 (1977).
- 36) 荒井達雄, 臨床医, **10**, 156 (1984).
- 37) 五十嵐脩, 食の科学, **91**, 67 (1985).
- 38) 小沢高将, "虚血と細胞障害" 早石 修, 八木国夫, 五島雄一郎編, 医歯薬出版, 東京, pp 121.
- 39) R. S. Hench, E. C. Kendall, C. H. Slocumb. and H. F. Polley Proc. Staff Meet. Maya Clin., **24**, 181 (1949).
- 40) H. Selye, "The stress of Life" McGraw-Hill Book co., New York (1956) pp 114.
- 41) R. R. Schmidt, S. Kaplan and J. J. Smith, J. Appl. Physiol., **46**, 298 (1979).
- 42) 浅田浩二, 代謝, **15**, 1277 (1978).
- 43) J. M. McCord and I. Fridovich, Biol. Chem. **244**, 6049 (1969).